

This Page Is Inserted by IFW Operations  
and is not a part of the Official Record

## BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images may include (but are not limited to):

- BLACK BORDERS
- TEXT CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- FADED TEXT
- ILLEGIBLE TEXT
- SKEWED/SLANTED IMAGES
- COLORED PHOTOS
- BLACK OR VERY BLACK AND WHITE DARK PHOTOS
- GRAY SCALE DOCUMENTS

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

As rescanning documents *will not* correct images,  
please do not report the images to the  
Image Problem Mailbox.

PAT-NO: JP401083153A

DOCUMENT-  
IDENTIFIER: JP 01083153 ATITLE: MEASURING METHOD OF MICRO-IMMUNOASSAY AND APPARATUS  
THEREFOR

PUBN-DATE: March 28, 1989

## INVENTOR-INFORMATION:

NAME COUNTRY  
TAMAI, TETSUO

## ASSIGNEE-INFORMATION:

NAME COUNTRY  
SHIMADZU CORP N/A

APPL-NO: JP62240452

APPL-DATE: September 25, 1987

INT-CL (IPC): G01N033/543

US-CL-CURRENT: 435/7.92

## ABSTRACT:

PURPOSE: To automate an entire analyzing process and thereby to prevent the infection of an analysis operator with a sample infected with a contagion, by a method wherein a reaction product which is combined with a solid phase after a peculiar reaction occurs is cleansed by spraying it with a cleansing liquid under the action of a centrifugal force.

CONSTITUTION: A rotor 2 driven by a stepping motor is provided along with a turntable-type sample tray 1. On the upper side of the rotor 2, a microplate mounting element 3 for mounting a microplate 4 is formed. Besides, a disk-shaped spray support 5 having eight sprays 22 is provided at the center part of the rotor 2 concentrically therewith. After a peculiar reaction occurs in a well 44, the rotor 2 is sprayed with a cleansing liquid by the sprays 22 while it is rotated. The cleansing liquid is applied onto the whole surface of the rotor 2 and scattered outside the rotor 2 by a centrifugal force generated by the rotation of the rotor 2 and strikes against an outer wall 29, and then it is gathered in a discharge channel 30 and discharged therethrough. By the outward flow caused by this centrifugal force, the inside of the well 44 is cleansed and free type antibodies are removed from the inside of the well.

COPYRIGHT: (C)1989,JPO&amp;Japio

## ⑫ 公開特許公報(A)

昭64-83153

⑪ Int.Cl.

G 01 N 33/543

識別記号

庁内整理番号

A-7906-2G

R-7906-2G

⑬ 公開 昭和64年(1989)3月28日

審査請求 未請求 発明の数 1 (全7頁)

⑭ 発明の名称 微量免疫測定法及びその装置

⑮ 特 願 昭62-240452

⑯ 出 願 昭62(1987)9月25日

⑰ 発 明 者 玉 井 哲 男 京都府京都市中京区西ノ京桑原町1番地 株式会社島津製作所三条工場内

⑱ 出 願 人 株式会社島津製作所 京都府京都市中京区西ノ京桑原町1番地

⑲ 代 理 人 弁理士 武田 正彦 外2名

## 明 細 書

1. 発明の名称 微量免疫測定法及びその装置

2. 特許請求の範囲

(1) 一方の反応物質が不溶化されている固相を使用して、分離された特異的反応生成物に関して測定を行う免疫測定法において、特異的反応の反応後、固相に結合した特異的反応生成物を、遠心力作用下に、洗浄液噴霧下を通過させて、洗浄液の噴霧により洗浄し、洗浄後特異的反応生成物に関して測定することを特徴とする微量免疫測定法。

(2) 試料分注部、複数の小形反応容器が装着されるロータ部及び測定部を具備する微量免疫測定装置において、ロータ部の試料容器載置位置に近い箇所に洗浄液噴霧装置が設けられていることを特徴とする微量免疫測定装置。

3. 発明の詳細な説明

(イ) 産業上の利用分野

本発明は、微量試料についての免疫測定法及びその装置に関し、特に、遊離型及び結合型の分離操作を必要とする微量試料についての免疫測定法

及びその装置に関する。

また、本発明は、例えば、血清、その他体液等の微量液体試料についてのラジオイムノアッセイ、フルオロイムノアッセイ、酵素免疫測定法等の免疫測定法による自動分析法及び装置に関し、殊にELISA法による自動分析法及びその装置に関する。

(ロ) 従来技術

酵素免疫測定法は、例えば、成人T細胞白血病、エイズ等関連の抗原抗体系をはじめとして、血漿蛋白成分、腫瘍マーカー、感染症及び自己免疫等関連の抗原抗体系等並びにホルモン及び酵素等の特異的な反応物質についての検査及び診断等に使用されている。

このような酵素免疫測定法は、一般に、例えば、抗原又は抗体固相化試験管又は同じく固相化マイクロプレートに一定量の例えば血清検体を採取して、これを希釈剤で希釈し、希釈後、例えば、37℃の抗原抗体反応温度に一定時間放置してインキュベートし、インキュベート後、洗浄液で洗

浄して遊離型を除去し、ついで、脱水して、冷却し、この冷却後、例えば室温に冷却後、一定量の基質緩衝液を分注して一定時間反応させて発色させ、発色後脱水乾燥させて測定することにより行われる。

このような酵素免疫測定法においては、使用される抗原又は抗体等の試薬が高価なところから、抗原又は抗体等の固相化分析容器、殊にマイクロプレートのウェルは、小形化されて、例えば、径2.5mm、深さ0.1乃至0.2mmの小穴に形成されており、一方、測定に使用される検体等の試料の量も、例えば、5 $\mu$ l乃至10 $\mu$ lと微量化している。

#### (ハ) 発明が解決しようとする問題点

このような微量免疫測定法を行うにあたっては、例えば、マイクロプレートの小形化に伴い、個々の操作について精密な操作が要求されるが、一部の工程が個別的に自動化されるにとどまり、夫々の工程間の移動はマニュアルで行われている。殊に、抗原抗体反応等の特異的反応の反応生成物につい

ての洗浄、脱水及び乾燥工程は、微量であるために、自動化が極めて難しく、各作業共人手によって行われており、全工程が一体化された自動化システムは、望まれるものの未だ実現されていない。

本発明は、微量免疫測定法及びその装置において、結合型と遊離型との分離を確実に行う洗浄、脱水及び乾燥工程の自動化に係る問題点を解決することを目的としている。

#### (ニ) 問題点を解決するための手段

本発明は、全分析作業工程が一体化され自動化されたシステムに形成することができる微量免疫測定法、特に微量酵素免疫測定法及びその自動微量免疫分析装置を提供することを目的としている。

本発明は、一方の反応物質が不溶化されている固相を使用して、分離された特異的反応生成物に関して測定を行う免疫測定法において、特異的反応の反応後、固相に結合した特異的反応生成物を、遠心力作用下に、洗浄液噴霧下を通過させて、洗浄液の噴霧により洗浄し、洗浄後特異的反応生成物に関して測定することの特徴とする微量免疫測

-3-

定法にあり、また、本発明は、試料分注部、複数の小形反応容器が装着されるロータ部及び測定部を具備する微量免疫測定装置において、ロータ部の試料容器設置位置に近い箇所に洗浄液噴霧装置が設けられていることを特徴とする微量免疫測定装置にある。

本発明において、特異的反応は、酵素免疫測定反応であり、測定対象に応じて、抗原抗体反応、ホルモン又は酵素等に由来する特異的反応を意味する。

本発明において、反応系の原系を構成する反応物質の一方は、反応容器又は担体に不溶化されている。これは、例えば、検体中に存在する該反応物質と特異的な反応物質と化学結合して、結合型とすることができる。

本発明において、所謂結合型と遊離型の分離は、洗浄液を遠心力作用下つまり、ロータと共に回転中のマイクロプレートに噴霧して行われる。したがって、本発明の微量酵素免疫測定装置には、マイクロプレート上に噴霧することができるように、

-4-

噴霧装置は、マイクロプレートを設置するロータ部の部分に対して、その内側、外側又は上方等の該ロータ部の部分に隣合う箇所に少くとも一基設けられる。しかし、噴霧装置は、液漏れ又は遠心力の作用による液の飛散等によりノズル先端が汚染されないように、ロータの内側に設けられるのが好ましい。この場合、噴霧装置は、ロータと共に回転するように配置してもよく、ロータの内側で、ロータとは別個に独立して設けることもできる。この場合、噴霧装置を正逆方向に回転可能に設けると、噴霧装置を、ロータと共に同方向に回転させることができ、また、ロータの回転とは逆方向に回転させることができるので、洗浄効果の調節を行うことができる。

本発明において、脱水及び乾燥は、ロータの回転下に行うことができる。ロータの回転速度は、ウェル中の液体が、回転するロータの遠心力により、ウェルから飛散させることができるように設定されるものであり、外界への飛散の程度に応じて適宜調整することができる。

-5-

-8-

## (ホ) 作用

本発明においては、抗原抗体反応等の特異的反応生成物を遠心力作用下に、洗浄液を噴霧させて行うので、比較的少量の洗浄液で、広範囲に均一に洗浄を行うことができる。しかも、本発明においては、洗浄工程に続く脱水乾燥を遠心力下に行うことができるので、脱水乾燥が比較的短時間に行うことができる。

このように、本発明においては、ロータを中心分析操作を行うことができるので、ロータ周囲に分析作業用装置を配設することによって自動化することができる。

## (ヘ) 実施例

以下、添付図面を参照して、本発明の実施の態様の一例を説明するが、本発明は、以下の説明及び例示によって何ら制限されるものではない。

第1図は、本発明の一実施例の自動酵素免疫測定装置の概略の平面図であり、第2図は、第1図のロータ部の概略の側断面図である。

本例においては、間欠的に回転駆動可能にステ

ッピングモータ等の駆動装置(図示されていない。)

に連結して、ターンテーブル型のサンプルトレイ1が設けられており、このサンプルトレイと並んで、間欠的な回転駆動及び連続的な回転駆動可能にステッピングモータ等の駆動装置(図示されていない。)に連結して、ロータ2が設けられている。本例においては、ロータ2の上面に、マイクロプレート4を設置するためのマイクロプレート載置部3が、マイクロプレート収容用の窪みに形成されており、マイクロプレートを所定の箇所に簡単に配置することができる。

ロータ2の中央部にロータ2と同心状に円板状のスプレー支持台5が設けられている。このスプレー支持用の回転台5には、ハブ6にねじ孔7が設けられており、このねじ孔7を回転軸8の上端部の止めねじ用の孔9に整合し、止めねじ(図示されていない。)をこれらねじ孔に挿通して、スプレー支持用の回転台5を回転軸8に固定する。回転軸8は、基台10にフランジ部11がボルト12によって固定される支持管13に挿通され、

-7-

軸受14及び15を介して、該支持管13に回転可能に支持されている。軸受14及び15は所謂ころがり軸受であり、その内輪は止め輪16及び17により回転軸8に支持されており、回転軸8の支持管13内での回転を円滑にさせる。回転軸8の下端部には、スプロケット18が取り付けられている。この場合、スプロケット18は、そのハブ19に設けられたねじ孔20を回転軸8の下端部に設けられたねじ孔21に整合し、これら二つのねじ孔20及び21に止めねじを挿通すると共に、キーを挿着して、回転軸8の下端部に取り付け固定される。スプロケット18はタイミングベルト用のスプロケットに形成されており、このスプロケット18とステッピングモータ等の駆動装置のスプロケットにタイミングベルト(いずれも図示されていない。)を掛け渡して、スプロケット18を介してスプレー支持用の回転台5を回転させることができる。

スプレー支持用の回転台5には、八箇のスプレー22が設けられている。スプレー22は、ス

-8-

プレー支持台5に設けられている洗浄用のバッファータンク(図示されていない。)に接続して設けられる。

一方、マイクロプレート載置用ロータ2の下部は、支持管13の外周を包囲する管軸部23に形成されており、この管軸部23は、支持管13に軸受24及び25により回転可能に支持されている。この軸受け24及び25はころがり軸受であり、その内輪は、夫々止め輪26及び27により支持管に取り付けられており、支持管13の周囲を廻る回転を容易にしている。管軸部23の下部には、タイミングベルト用のスプロケット28が形成されており、このスプロケット28とステッピングモータ等の駆動装置にタイミングベルト(いずれも図示されていない。)を掛け渡して、管軸部23のスプロケット28を介して、マイクロプレート載置用のロータ2を回転させる。

本例においては、マイクロプレート載置用ロータ2の外周を囲んで別途に外壁29が形成されており、前記ロータ2と共に排出路30が形成され

ている。もとより、この外壁29は、マイクロプレート載置用のロータ2の外側に排出路相当の間隔をおき、かつ底部等に排出口を設けて、マイクロプレート載置用のロータ2と一体に形成することができる。

また、本例においては、マイクロプレート載置用のロータ2の周囲には、試料又は試薬分注用のプローブ31、マイクロプレート供給装置32及びマイクロプレート測定用比色計33が設けられている。この試料及び試薬分注用プローブ31が設けられている箇所は、試料又は試薬の分注位置34に接近する箇所であり、マイクロプレート供給装置32が設けられている箇所は、マイクロプレート供給位置35に接近する箇所である。また測定用比色計33が設けられている箇所は測定位置36に接近する箇所である。本例においては、測定装置は説明の便宜上可動型としているが、もとより固定型とすることもできる。

本例において、前記試料及び試薬の分注用プローブ31は回転支持軸37に回転可能に支持され

ており、その試料及び試薬分注用プローブ31のノズル部38の回転時の移動通路39に沿って、ロータ2とサンプルトレイ1の間に、洗浄つば40、三箇の試薬つば41が配設されている。

本例は、以上のように構成されており、例えば次のようにして酵素免疫測定が行われる。

サンプルトレイ1に、例えば、患者の血清を入れた検体カップ42をライン43に沿って配列する。一方ロータ2は、間欠的に回転して、ロータ2の各マイクロプレート載置部3を、マイクロプレート載置位置35に順次移動させ、マイクロプレート供給装置32からマイクロプレート4を供給して、夫々のマイクロプレート載置部3にマイクロプレートを載置する。本例において、マイクロプレート4には多数のウェル44が形成されており、各ウェル内壁には、抗原抗体試薬、例えば、カルバス(Karupas)細胞株の不活化エイズウイルスが固定されている。

ロータ2に載置されたマイクロプレート4が、検体分注位置34に送られたところで、そのマイ

-11-

クロプレート4の各ウェル44には、分注用プローブ31によって、2 $\mu$ lの試料と8 $\mu$ lの脱気水が同時に分注される。分注用プローブ31による検体の分注は、サンプルトレイ1の試料吸引位置45に位置する検体カップ42から所定量の試料を吸引して行われる。

ロータ2に載置された各マイクロプレート4のウェル44に試料の分注が終了したところで、外壁29を含めロータ2の上方はカバー(図示されていない。)で覆われ、カバー内のロータ2上は、例えば、エアバス等により、37℃の恒温に1時間保ち、ウェル内で抗原抗体反応を行わせる。1時間の反応後、ロータ2を回転させながら、洗浄液タンク(図示されていない。)の洗浄液、例えば、ウシ血清アルブミン及びリン酸バッファ含有のpH7.4の水溶液をスプレー部22から噴霧する。洗浄液はロータ2の全面に噴霧され、ロータの回転による遠心力により、ロータ2の外方に飛ばされ、外壁29に当たって排出路30に集められ排出される。この遠心力による外方への流れに

-12-

より、ウェル44内は洗浄され、遊離型の抗体はウェル内から除かれる。マイクロプレート4のウェル44が十分に洗浄されたところで、スプレー部22からの噴霧を停止すると共に、ロータ2を回転速度200rpmで5分間回転させ、ウェル44内を脱水する。脱水後、覆いを取り去ると共に、ロータ2を4℃に冷却して、エイズ抗体と非特異的に反応する酵素試薬溶液例えば、蛋白A-わさび大根より抽出した過酸化酵素のアロテインA-ホースラディッシュペロキシダーゼ(ProteinA-Horseradish-peroxidase)のpH7.4の溶液10 $\mu$ lを、試薬つば41から分注用プローブ31により、各マイクロプレート4のウェル44に分注する。各マイクロプレート2について、分注操作が完了したところで、再びロータ2上を覆い4℃の温度で30分反応させる。30分の反応後、室温下にロータ2を回転させながら、洗浄液タンクの洗浄液、例えば、ウシ血清アルブミン及びリン酸バッファ含有のpH7.4の水溶液をスプレー部22から噴霧して、前記エイズ抗体と非特異的に

-13-

-302-

-14-

反応する酵素試薬を洗浄除去する。洗浄後、ロータを200rpmの回転速度で回転し、洗浄液を除去する。

次いで、各マイクロプレート4のウェル44に、試薬つば41'から、発色試薬、例えば、アミノエナルカルバゾールの過酸化水素溶液10μlを分注プローブ31によって分注し、室温にて5分間放置する。5分間放置後、ロータ2上を回って、洗浄液タンクの洗浄液をスプレー22から噴霧して、前記発色試薬を洗浄除去する。洗浄除去後、ロータを200rpmの回転速度で回転して洗浄液を除去する。

洗浄液を除去した後、皿を取り除いて、マイクロプレート測定用比色計33をロータ2の位置に移動させ、ロータ2のマイクロプレート設置部の光学窓を介して、490乃至500nmの波長の吸光度を測定して、検体中のエイズ抗体の測定を行う。

本例においては、測定終了後にマイクロプレートを例えば、マイクロプレート供給位置35まで

移動させて、例えば、真空チャック等を使用してロータ2から取り外し、新規なマイクロプレートを、マイクロプレートが取り外されたマイクロプレート設置部3に供給設置し、次の測定操作を行う。

本例においては、分注工程及び測定工程のいずれの工程も同次の駆動の停止時に行われている。

本例は、皿を外壁に至るロータ部上に限定するタイプとしたが、ロータを容用のハウジング内に移動可能とすることもできる。

本例において、スプレー支持用回転台を、ロータと別個に形成したが、これは、マイクロプレート上の洗浄を均一に行うためであり、ロータ上にマイクロプレートを固定して、しかもスプレーがマイクロプレート上に均一に噴霧できれば、ロータのマイクロプレートの固定位置に近接してスプレーを固設することができる。

#### (ト) 発明の効果

本発明においては、抗原抗体反応等の特異的反応生成物を遠心力作用下に、一律に洗浄液を噴霧

-15-

させて行うので、従来、酵素免疫測定工程における各反応工程後の洗浄工程を反応工程と同一のロータ上で機械的に行えることになり、測定工程の全工程の自動化を行うことができる。

したがって、本発明は、従来の酵素免疫測定方法及び装置と比較して、処理能力が向上することになり、経済的にすぐれており、さらに従来困難とされていた集団検診を行うことができる。

また、本発明は、人手によらないで全測定工程を行うことができるので、分析作業員の病原感染試料による感染を防止することができる。

#### 4. 図面の簡単な説明

第1図は、本発明の一実施例の自動酵素免疫測定装置の概略の平面図であり、第2図は、第1図のロータ部の概略の側断面図である。

図中の符号については、1はサンプルトレイ、2はロータ、3はマイクロプレート設置部、4はマイクロプレート、5はスプレー支持用の回転台、6はハブ、7はねじ孔、8は回転軸、9は止めねじ用の孔、10は基台、11はフランジ部、12

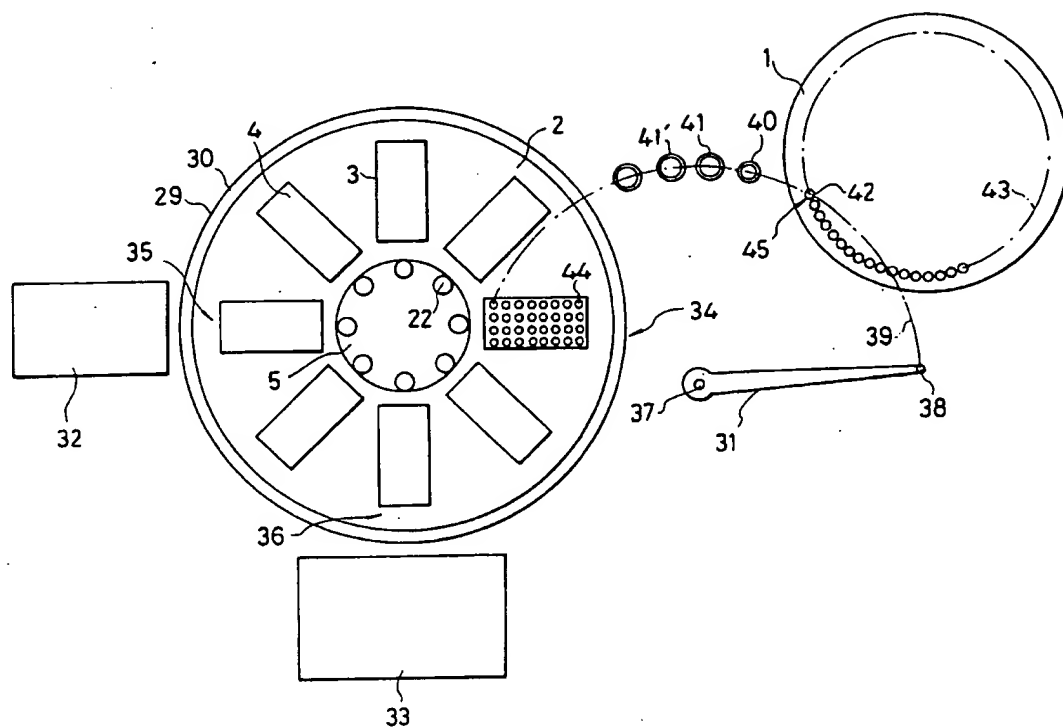
-16-

はボルト、13は支持管、14及び15は軸受、16及び17は止め輪、18はスプロケット、19はハブ、20及び21はねじ孔、22はスプレー、23は管端部、24及び25は軸受、26及び27は止め輪、28はタイミングベルト用のスプロケット、29は外壁、30は排出路、31は試料又は試薬分注用プローブ、32はマイクロプレート供給装置、33はマイクロプレート測定用比色計、34は試料又は試薬の分注位置、35はマイクロプレート供給位置、36は測定位置、37は回転支持軸、38はノズル部、39は移動通路、40は洗浄つば、41及び41'は試薬つば、42は検体カップ、43はライン、44はウェル、45は試料吸引位置である。

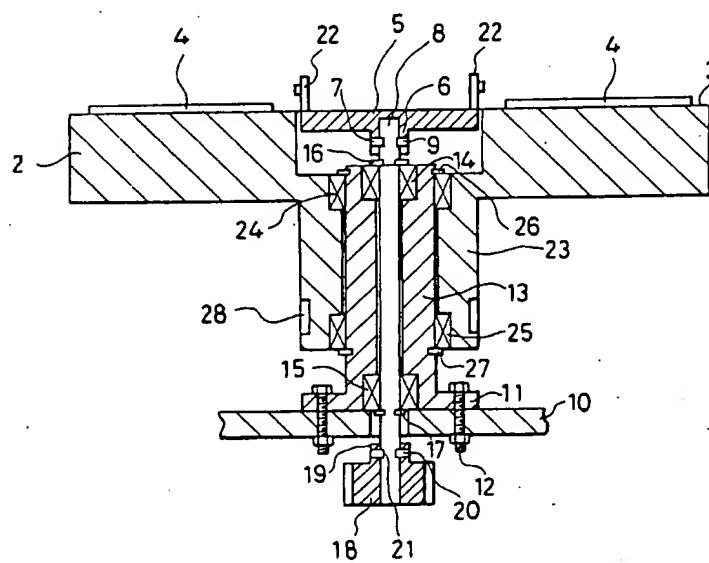
#### 代理人

弁理士 武田 正彦  
弁理士 滝口 昌司  
弁理士 中里 浩一

第 1 図



第 2 図





手続補正書(方式)

昭和63年1月21日

特許庁長官 殿

1. 事件の表示

昭和62年特許願第240452号

2. 発明の名称 微量免疫測定法及びその装置

3. 補正をする者

事件との関係 特許出願人

名 称 (199)株式会社 島津製作所

4. 代理人

住所 東京都千代田区内幸町1丁目1番1号  
(インペリアルビル) 電話 508-8050

氏 名 (7508) 弁理士 武 田 正 彦



5. 補正命令の日付 自発

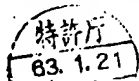
6. 補正の対象

願書

7. 補正の内容

- (1) 願書中の右上方肩に「特許法第38条ただし書の規定による特許出願」の適用条文を記載した補正をする。
- (2) 願書中に「2. 特許請求の範囲に記載された発明の数2」と記載した欄を設けた補正をする。

以 上



方式